北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

紫花苜蓿*MsGOLS2*基因的克隆及功能鉴定

张新宇 刘晓霞 安雯 麻冬梅 马巧利 郎思睿

Cloning and functional identification of *MsGOLS2* gene in *Medicago sativa*

Zhang Xinyu, Liu Xiaoxia, An Wen, Ma Dongmei, Ma Qiaoli, Lang Sirui

引用本文:
张新宇, 刘晓霞, 安雯, 麻冬梅, 马巧利, 郎思睿. 紫花苜蓿*MsGOLS2*基因的克隆及功能鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(6):111–122. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240433
Zhang Xinyu, Liu Xiaoxia, An Wen, Ma Dongmei, Ma Qiaoli, Lang Sirui. Cloning and functional identification of *MsGOLS2* gene in *Medicago sativa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(6):111–122. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240433

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240433

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

白桦*BpPAT1*基因的表达模式及耐盐性分析
Expression patterns and salt tolerance analysis of *BpPAT1* gene in *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2021, 43(10): 18–27. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200302

白桦*BpCHS3*转基因植株耐盐性分析
Evaluation of salt tolerant performance of *BpCHS3* transgenic plants in *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2019, 41(4): 1–7. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180224

白桦*BpTCP2*基因的克隆及表达特性分析
Cloning and expression characteristics analysis of *BpTCP2* gene in *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2019, 41(8): 57–66. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180430

过表达胡杨*PeRIN4*基因拟南芥提高质膜H^+–ATPase活性和耐盐性
Over–expression of *PeRIN4* enhanced salinity tolerance through up–regulation of PM H^+–ATPase in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2017, 39(11): 1–8. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170124

青*PwPEBP*基因及其启动子序列的克隆与表达分析
Cloning and expression analysis of *PwPEBP* gene and promoter sequence in *Picea wilsonii*
北京林业大学学报, 2019, 41(4): 8–20. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180344

过表达细叶百合*LpNAC6*基因增强烟草的耐盐性
Overexpression of *LpNAC6* gene in *Lilium pumilum* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco
北京林业大学学报, 2020, 42(4): 69–79. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190342

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240433

紫花苜蓿 *MsGOLS2* 基因的克隆及功能鉴定

张新宇[1,2,3] 刘晓霞[1,2,3] 安 雯[1,2,3] 麻冬梅[1,2,3] 马巧利[4] 郎思睿[5,6]

(1. 宁夏大学西北土地退化与生态系统恢复国家重点实验室培养基地，宁夏 银川 750021；2. 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室，宁夏 银川 750021；3. 宁夏大学生态环境学院，宁夏 银川 750021；4. 宁夏大学林业与草业学院，宁夏 银川 750021；5. 宁夏大学生命科学学院，宁夏 银川 750021；6. 宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室，宁夏 银川 750021)

摘要:【目的】盐胁迫是影响植物生长的重要因素，肌醇半乳糖苷合成酶(GOLS)在植物响应非生物胁迫的过程中有着重要作用。本研究通过探究紫花苜蓿 *GOLS* 基因在盐胁迫响应过程中的作用，旨在为揭示紫花苜蓿的耐盐分子调控机制奠定理论基础，为紫花苜蓿的抗逆分子设计育种提供宝贵的基因资源。**【方法】**克隆紫花苜蓿 *MsGOLS2* 基因，利用生物信息学软件分析其基因序列和蛋白结构，构建进化树，并进行亚细胞定位。利用荧光定量 PCR 探究 *MsGOLS2* 在紫花苜蓿不同器官中以及盐胁迫下的表达特异性。将紫花苜蓿 *MsGOLS2* 基因在拟南芥中异源表达，并进行盐胁迫处理，从表型、生理和分子水平上分析过表达 *MsGOLS2* 对拟南芥耐盐性的影响。**【结果】**(1)*MsGOLS2* 编码区序列全长 987 bp，编码 328 个氨基酸；MsGOLS2 为亲水性膜内蛋白，与蒺藜苜蓿和大豆的 GOLS2 的亲缘关系较近。(2)亚细胞定位结果显示 MsGOLS2 在细胞质和细胞核中均有表达。(3)*MsGOLS2* 的表达量在紫花苜蓿根中最高，并且在盐胁迫下表达量显著升高。(4)过表达 *MsGOLS2* 拟南芥植株的主根长度显著高于野生型植株；盐胁迫后，过表达 *MsGOLS2* 拟南芥中丙二醛含量低于野生型，脯氨酸含量、过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性高于野生型，抗氧化酶相关基因的表达水平变化与酶活性的变化趋势一致。**【结论】**紫花苜蓿 *MsGOLS2* 能够响应盐胁迫，提高植物的耐盐性。本研究不仅为解析紫花苜蓿 *MsGOLS2* 的基因功能提供了重要依据，并为紫花苜蓿耐盐种质资源的筛选培育、创新改良提供了关键的候选基因资源。

关键词：紫花苜蓿；*MsGOLS2* 基因；基因克隆；基因表达；耐盐性；转基因

中图分类号：S541 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)06−0111−12

引文格式：张新宇，刘晓霞，安雯，等. 紫花苜蓿 *MsGOLS2* 基因的克隆及功能鉴定 [J]. 北京林业大学学报，2025，47(6)：111−122. Zhang Xinyu, Liu Xiaoxia, An Wen, et al. Cloning and functional identification of *MsGOLS2* gene in *Medicago sativa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(6): 111−122.

Cloning and functional identification of *MsGOLS2* gene in *Medicago sativa*

Zhang Xinyu[1,2,3] Liu Xiaoxia[1,2,3] An Wen[1,2,3] Ma Dongmei[1,2,3] Ma Qiaoli[4] Lang Sirui[5,6]

(1. Breeding Base for State Key Laboratory of Land Degradation and Ecological Restoration in Northwestern China, Yinchuan 750021, Ningxia, China;
2. Key Laboratory for Restoration and Reconstruction of Degraded Ecosystems in Northwestern China of Ministry of Education, Yinchuan 750021, Ningxia, China;
3. School of Ecology and Environment, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China;
4. School of Forestry and Prataculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China;
5. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China;
6. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

收稿日期: 2024−12−13 **修回日期:** 2025−03−15

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发项目（2024BBF02001），宁夏回族自治区重点研发计划(引才专项)项目(2021BEB04075)。

第一作者: 张新宇。主要研究方向：作物逆境生理与分子生态学。Email：1103167396@qq.com 地址：750021 宁夏回族自治区银川市西夏区贺兰山西路 489 号宁夏大学生态环境学院。

责任作者: 刘晓霞，助理研究员。主要研究方向：作物逆境生理与分子生态学。Email：liuxiaoxia0856@163.com 地址：同上。

本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

Abstract: [**Objective**] Salt stress is an important factor affecting plant growth, and galactinol synthase (GOLS) plays an important role in plant response to abiotic stress. This study explored the role of *GOLS* gene in salt stress response process of alfalfa, aiming to lay a theoretical foundation for revealing molecular regulatory mechanism of salt tolerance in alfalfa and provide valuable genetic resources for stress-resistant molecular design breeding of alfalfa. [**Method**] Alfalfa *MsGOLS*2 gene was cloned, gene sequence and protein structure were analyzed by bioinformatics software, an evolutionary tree was constructed, and subcellular localization was conducted. The expression specificity of *MsGOLS*2 in different organs of alfalfa under salt stress was analyzed by fluorescence quantitative real-time PCR. The *MsGOLS*2 gene of alfalfa was heterogeneously expressed in arabidopsis and subjected to salt stress treatment, the effects of overexpression of *MsGOLS*2 on salt tolerance of arabidopsis were analyzed at phenotypic, physiological and molecular levels. [**Result**] (1) The total length of *MsGOLS*2 coding region sequence was 987 bp, encoding 328 amino acids. MsGOLS2 was a hydrophilic intracellular protein and closely related to GOLS2 in *Medicago truncatula* and soybean. (2) The subcellular localization results showed that MsGOLS2 was expressed in both cytoplasm and nucleus. (3) The expression level of *MsGOLS*2 was the highest in roots of alfalfa and significantly increased under salt stress. (4) The main root length of arabidopsis plants overexpressing *MsGOLS*2 was significantly higher than wild-type plants. After salt stress, the malondialdehyde content in arabidopsis overexpressing *MsGOLS*2 was lower than wild type, while the proline content, peroxidase and superoxide dismutase activities were higher than wild type. The changes in expression levels of antioxidant oxidase-related genes were consistent with changing trend of enzyme activities. [**Conclusion**] Alfalfa *MsGOLS*2 can respond to salt stress and enhance the plant's salt tolerance. This study can not only provide an important basis for analysis of gene function of *MsGOLS*2 in alfalfa, but also offer key candidate gene resources for screening, breeding, innovation and improvement of salt-tolerant germplasm resources in alfalfa.

Key words: *Medicago sativa*; *MsGOLS*2 gene; gene clone; gene expression; salt tolerance; transgenosis

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种豆科(Fabaceae)多年生牧草,以其高产量、优良口感和丰富的营养价值著称,被广泛种植于世界各地,具有极高的经济价值[1−2]。作为重要的牧草资源,苜蓿在我国西北、华北及东北地区种植面积广泛[3]。然而,随着土地盐碱化程度的加剧,紫花苜蓿的生产力和生长持久性受到严重影响,其经济效益也随之降低。因此,以基因组学为基础[4],深入探究紫花苜蓿响应盐胁迫的分子调控机制,并挖掘关键耐盐基因,对于培育紫花苜蓿抗逆新品种,提高盐渍化土地利用率具有极其重要的意义。

棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides,RFOs)是存在于高等植物体内的一种可溶性糖类,广泛参与植物的糖分的储存和运输、信号转导、抗氧化以及逆境胁迫响应等多个生理过程,并发挥关键作用[5]。肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase,GOLS)是棉子糖系列寡糖合成途径第一步的重要催化酶,也是该途径的限速酶,在植物抵御逆境胁迫过程中扮演着不可或缺的角色[6]。多项研究表明,*GOLS* 的表达能够显著增强植物的逆境抵抗力。例如,黄瓜(*Cucumis sativus*)的 *CsGOLS*4 能够显著响应干旱和寒冷胁迫,过表达 *CsGOLS*4 可以增加棉子糖含量,减少干旱和低温胁迫下活性氧的损害,从而增强植株对干旱和寒冷胁迫的耐受性[7]。在芝麻(*Sesamum indicum*)中鉴定出 7 个 *GOLS* 基因,其中 *SiGOLS*2、*SiGOLS*7 与拟南芥 *AtGOLS*2 亲缘关系更近,并且在干旱和盐胁迫条件下表达量升高,暗示其可能参与了相关胁迫的响应过程[8]。甜橙(*Citrus sinensis*)的 *CsGOLS*6 通过提升抗氧化代谢产物的水平,来增强植株对干旱和盐胁迫的抵抗力[9]。在玉米(*Zea mays*)中,2 个 *ZmGOLS* 基因协同调控肌醇半乳糖苷的合成,超表达 *ZmGOLS*2 可显著提高拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的逆境适应能力,且证实该基因通过 ABA 信号途径增强了植物的抗逆性[10]。此外,在旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica*)中,*BhGOLS* 通过参与 ABA 途径来响应干旱胁迫[11];与 *BhGOLS* 高度同源的刺齿报春苣苔(*Primulina spinulosa*)的 *PsGOLS* 在抵抗干旱胁迫过程中也起着重要作用[12]。作为紫花苜蓿的亚种,黄花苜蓿(*Medicago falcata*)中的 *MfGOLS*1 能够显著提高转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)的耐寒性,同时也增强了其耐旱性和耐盐性,这充分体现了 *GOLS* 基因在抵抗非生物胁

迫中的重要作用[13]。尽管目前对拟南芥[14]、茶树（*Camellia sinensis*）[15]、鹰嘴豆（*Cicer arietinum*）[16]等多种植物的 *GOLS* 基因已有较多研究，但对于紫花苜蓿中的 *MsGOLS* 基因的研究仍相对较少。因此，深入探究紫花苜蓿 *MsGOLS* 的功能具有重要的科学意义。

本研究拟选用紫花苜蓿“中苜 1 号”（*Medicago sativa* ‘Zhongmu No.1’）作为试验材料，对前期转录组数据中筛选出的显著响应盐胁迫的 *MsGOLS2* 进行克隆，并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位和表达模式研究，进一步通过在拟南芥中异源表达 *MsGOLS2*，从表型、生理和分子水平上系统地解析紫花苜蓿 *MsGOLS2* 在干旱响应过程中的功能。研究结果将为揭示紫花苜蓿的耐盐调控机制提供理论依据，并为紫花苜蓿的抗逆分子设计育种提供重要的基因资源。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验材料包括紫花苜蓿和拟南芥野生型（Col-0），均保存于本实验室。所有植物均在人工智能气候生长室内进行培育，培养温度为 20 ℃，相对湿度为 50% ~ 60%，光照周期交替为 16 h 光/8 h 暗，光照强度为 160 μmol/（m^2·s）。

RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、pTOPO vector 等购自艾德莱生物公司，反转录试剂盒、高保真酶、胶回收试剂盒、同源重组试剂盒、荧光定量试剂盒等采购于南京诺唯赞生物公司，大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、农杆菌 GV3101 感受态细胞采购于唯地生物公司。丙二醛、脯氨酸含量和过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性等生理指标测定试剂盒购自 Solarbio 生物公司。

1.2　研究方法

1.2.1　*MsGOLS2* 基因克隆和生物信息学分析

从 NCBI 基因组数据库中获取紫花苜蓿“中苜 1 号”全基因组数据，并从中搜索 *GOLS2* 序列，利用 SnapGene 6.0.2 软件设计 *GOLS2* CDS 序列扩增引物 GOLS2-F/R（表 1）。利用 RNA 提取试剂盒提取紫花苜蓿总 RNA，并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行紫花苜蓿 *GOLS2* 的 CDS 序列克隆，

表 1　本实验所用引物序列

Tab. 1　Primer sequences used in this experiment

引物名称	引物序列（5′—3′）	用途
GOLS2-F	ATGGCACCTGCAATCACCACTGC	基因克隆
GOLS2-R	TTAAGCAGCATTTGATGCAGGC	基因克隆
UBQ10-GOLS2-HR-F	ATCTGAGTTTTTCTGATTAACAGCCATGGCACCTGCAATCACCACTGC	载体构建
UBQ10-GOLS2-HR-R	TTCGAGCTCTATCGATCAATCAACTAGTTTAAGCAGCATTTGATGCAGGC	载体构建
pCF203-GOLS2-HR-F1	GAGAACACGGGGGACGAGCTCATGGCACCTGCAATCACCA	载体构建
pCF203-GOLS2-HR-R1	CATGATTATATCTCCTTGGATCCGAGCAGCATTTGATGCAGGCA	载体构建
GOLS2-qPCR-F	TCCTTGCTGGAAACGCTGAT	荧光定量PCR
GOLS2-qPCR-R	AGGAGGCTTGGGACCAAAATTA	荧光定量 PCR
MsRer1-F	CCTTTGGTGATCCTGAGCTGG	内参基因
MsRer1-R	AAAGCTTTAGTCGGCACGAGAG	内参基因
MsGOLS2-SQ-F	AGTACAGCAAGATGATCTACTTAGA	半定量PCR
MsGOLS2-SQ-R	CTCGTCTTCATATATATCTTTCCAT	半定量PCR
At18S-F	ATGGCCGATGGTGAGGACATTC	内参基因
At18S-R	GGTGCGACCACCTTGATCTTC	内参基因
AtPOD-F1	ATGATATCGGAGCAAGAGACTGT	荧光定量PCR
AtPOD-R1	CTACTCCAAATCATGCCCTAAATTCC	荧光定量 PCR
AtSOD-F1	ATCACAGAGCTTACGTGGACAAC	荧光定量 PCR
AtSOD-R1	GTTCTGGAAGTCAAGGTAGTAAGCA	荧光定量 PCR

PCR 扩增反应体系为 cDNA 模板 2 μL，正、反向引物各 1 μL，高保真酶 2 × Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）25 μL，ddH_2O 21 μL，总体积 50 μL。将回收后纯化的 PCR 产物连接到 pTOPO 载体上，并转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中，在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆，进行菌落 PCR 和测序鉴定。

利用 SnapGene 6.0.2 软件对测序得到的序列进行拼接，获得了紫花苜蓿 *GOLS2* 的基因序列，将其命名为 *MsGOLS2*。将 *MsGOLS2* 基因序列翻译为对应的蛋白序列，利用 ExPASy 平台（http://www.expasy.org）上的 ProtParam 和 ProScale 工具预测 MsGOLS2 蛋白的理化性质，通过 TMHMM Server 2.0 在线工具（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM）预测分析 MsGOLS2 蛋白的跨膜结构特征，利用在线软件 SOPMA（https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html）预测 MsGOLS2 蛋白的二级结构[17]。此外，利用 DNAMAN 软件对紫花苜蓿 MsGOLS2 蛋白序列和大豆（*Glycine max*）、蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）、拟南芥、玉米的 GOLS 蛋白序列进行比对分析，并利用 MEGA 软件构建进化树。

1.2.2 pCF203-GOLS2-GFP 载体构建与亚细胞定位

以含有 *MsGOLS2* 序列的质粒为模板，用包含 pCF203 载体双酶切位点同源臂的 pCF203-GOLS2-HR-F/R（表 1）作为引物，利用高保真 DNA 聚合酶克隆出 *MsGOLS2* 的完整序列。通过限制性内切酶 *Sac*I 和 *Bam*HI 对含有 *GFP* 基因的 pCF203 质粒进行双酶切，将含有同源臂的 *MsGOLS2* 片段和双酶切处理后的 pCF203 载体进行同源重组连接，然后将重组产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，提取重组质粒 pCF203-GOLS2-GFP。将重组质粒瞬时转化至拟南芥原生质体中，进行亚细胞定位。

1.2.3 *MsGOLS2* 表达模式分析

参考张锦锦[18]的处理方法，选取 100、150、200 mmol/L NaCl 3 种浓度进行预实验，发现 200 mmol/L NaCl 处理下的紫花苜蓿生长表型差异最为显著，因而选取 200 mmol/L 作为分析紫花苜蓿中 *MsGOLS2* 表达模式的 NaCl 浓度。将紫花苜蓿“中苜 1 号”种子在土壤中播种 10 d 后，转移至含有霍格兰营养液的水培盒中继续培养 12 d。选取生长状况良好、生长状态一致的植株，用 200 mmol/L NaCl 溶液胁迫处理，采用荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测 0、2、4、8 h 时紫花苜蓿不同器官 *MsGOLS2* 表达量。采集处理过的紫花苜蓿根、茎、叶样品，经液氮快速冷冻后，保存于−80 ℃ 冰箱中，后提取紫花苜蓿不同器官总 RNA，并反转录成 cDNA。利用 SnapGene 6.0.2 软件，设计用于 *MsGOLS2* 荧光定量 PCR 的引物 GOLS2-qPCR-F1/R1（表 1），以 cDNA 为模版，以紫花苜蓿 *MsRer*1（GenBank：JZ818481）为内参基因，进行荧光定量 PCR（RT-qPCR）。RT-qPCR 反应体系为 cDNA 模板 2 μL，2 × ChamQ Universal SYBR PCR Master Mix 10 μL，正、反向引物各 0.4 μL，ddH_2O 7.2 μL，总体积 20 μL，反应程序为变性、退火、延伸 3 步法。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 *MsGOLS2* 的表达量。以上述方法测定正常条件下 *MsGOLS2* 在根、茎、叶不同器官中的表达量。为确保结果的准确性，实验进行 3 次技术重复，每次技术重复包含 4 个样品重复。

1.2.4 转基因拟南芥的获得

以含有 *MsGOLS2* 序列的质粒为模板，用包含 pCAMBIA1300 载体双酶切位点同源臂的 UBQ10-GOLS2-HR-F/R（表 1）作为引物，利用高保真 DNA 聚合酶克隆出 *MsGOLS2* 的完整序列。通过限制性内切酶 *Nco*I 和 *Spe*I 对 pCAMBIA1300 质粒进行双酶切，将含有同源臂的 *MsGOLS2* 片段和双酶切处理后的 pCAMBIA1300 载体进行同源重组连接，然后将重组产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，提取测序验证后的重组质粒 pCAMBIA1300-GOLS2。分别将空载体和重组质粒转化到农杆菌 GV3101 中，通过沾花法侵染拟南芥，待其成熟后收获 T_0 代转空载体和 *MsGOLS2* 转基因拟南芥种子。

1.2.5 转基因拟南芥的筛选和鉴定

将收取的 T_0 代种子点播在含有 40 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 固体培养基上，筛选阳性植株并将其转移至营养土中继续生长，成熟后收取 T_1 代种子。在抗性培养基上继续筛选 T_1 代种子中的阳性植株，直至获得能够稳定表达目标基因的 T_2 代转基因纯合拟南芥种子和 T_2 代转空载体拟南芥种子。

在 1/2 MS 固体培养基上点播 T_2 代转基因拟南芥种子，竖直培养 7 d 后，收取样品。一部分样品提取 RNA 并反转录 cDNA，以 cDNA 为模板，以 MsGOLS2-SQ-F/R（表 1）为特异性引物，以拟南芥 18S 核糖体 RNA（Gene ID：3769408）为内参基因，通过半定量 PCR 技术检测分析转基因拟南芥中 *MsGOLS2* 的表达情况。另一部分样品提取基因组 DNA，以基因组 DNA 为模板，以 UBQ10-GOLS2-HR-F（表 1）为特异性引物，进行转基因 PCR 分子鉴定。

1.2.6 盐胁迫下拟南芥的表型和根长分析

参照王园等[19]的处理方法，进行 75、100、150 mmol/L 3 种 NaCl 浓度梯度的预实验，发现 75 mmol/L

NaCl 处理下拟南芥表型差异显著，因而选取 75 mmol/L 作为表型耐盐性分析的 NaCl 处理浓度。将野生型（WT）拟南芥种子、转空载体（MOCK）和获得的 T_2 代转基因种子在超净工作台中用 75% 的酒精消毒 20 min，随后用无菌水清洗 5 次。将消毒后的种子均匀点播在 1/2 MS 固体培养基上，在 4 ℃ 冰箱中低温处理 48 h 后，转移至正常条件下竖直生长 4 d。选取生长状态相近的幼苗，分别转移到含有 0 mmol/L（正常条件下）和 75 mmol/L NaCl（盐胁迫条件下）的 1/2 MS 固体培养基上，继续竖直生长。培养 3～4 d 后，拍照记录表型差异。为了量化分析幼苗的生长情况，使用 ImageJ 软件测量拟南芥幼苗的根长。

1.2.7　盐胁迫下拟南芥的生理指标和抗氧化酶活性测定以及抗氧化酶相关基因表达水平的检测

参照王园等[19]的处理方法及表型实验中的预实验结果，设置了 75 和 150 mmol/L 2 种 NaCl 浓度进行预实验，发现 150 mmol/L NaCl 处理土壤中生长的拟南芥生理指标差异显著，因而选取 150 mmol/L 作为生理指标和分子响应分析的 NaCl 处理浓度。将在 1/2 MS 固体培养基中生长 7～10 d 的各株系拟南芥移到营养土中，继续培养 14 d 后，选取长势一致且良好的幼苗分别进行正常浇水处理（对照组）和用 150 mmol/L NaCl 溶液处理（实验组），24 h 后采集各处理不同株系拟南芥叶片[16]。利用 Solarbio 生理指标测定试剂盒（BC0025，BC0295，BC0095，BC0175）分别测定丙二醛（malondialdehyde，MDA）、脯氨酸含量（proline，Pro）和过氧化物酶（peroxidase，POD）、超氧化物歧化酶活性（superoxide dismutase，SOD）。

将采集的叶片样品液氮速冻，然后研钵冷冻研磨，提取总 RNA 并反转录成 cDNA，以 GOLS2-qPCR-F1/R1、AtPOD-F1/R1、AtSOD-F1/R1（表 1）为引物，以拟南芥 *At*18*S* 为内参基因，通过 RT-qPCR 检测 *AtSOD*、*AtPOD* 基因的表达水平，计算方法和程序设计同 1.2.3。

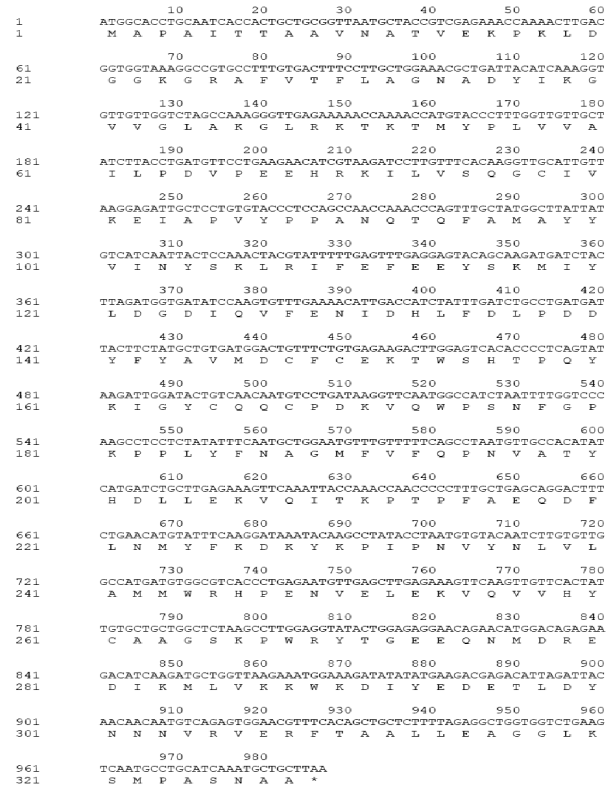
1.3　数据分析

试验数据通过 Excel、GraphPad.Prism.9.5 软件进行处理和统计。通过 IBM SPSS 25 进行单因素方差分析，显著性水平设置为 $P < 0.1$。

2　结果与分析

2.1　紫花苜蓿 *MsGOLS2* 的克隆和生物信息学分析

从紫花苜蓿中克隆得到 *MsGOLS2* 完整的编码区序列，NCBI 登录号为 PP782004。该编码区长 987 bp，共编码 328 个氨基酸（图 1）。对 *MsGOLS2* 编码的



ATG 为起始密码子，*为终止密码子。

图 1　*MsGOLS2* 核苷酸序列及其翻译的氨基酸序列

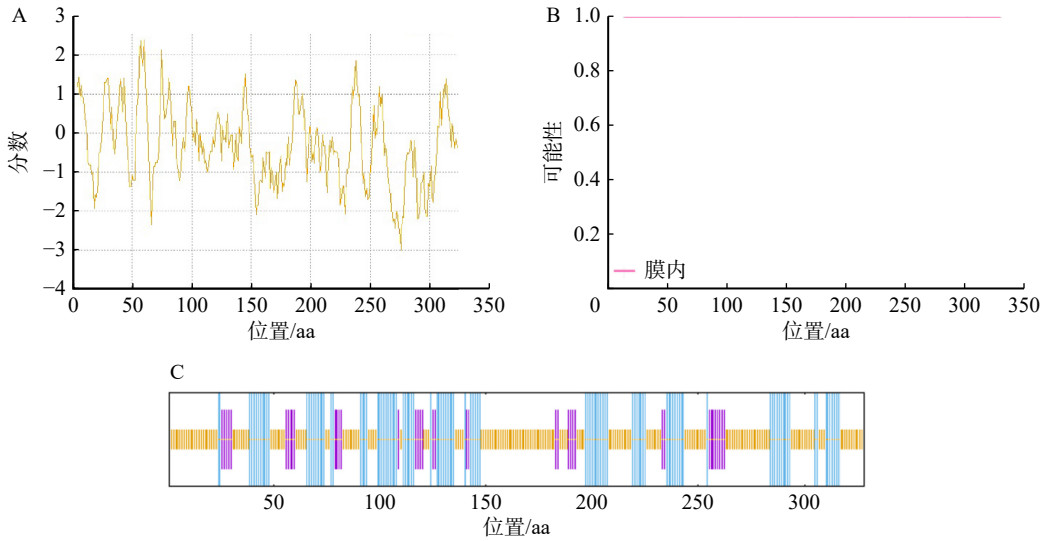
Fig. 1　*MsGOLS2* nucleotide sequence and amino acid sequence

蛋白质进一步进行生物信息学分析发现：MsGOLS2 蛋白的理论相对分子质量为 37.63 kDa，理论等电点为 5.93；亲水性预测值为−9.8，为亲水性蛋白质（图 2A）；属于典型的膜内蛋白（图 2B）。二级结构预测的结果显示，MsGOLS2 蛋白主要由 55.79% 的无规则卷曲、32.32% 的 α 螺旋和 11.89% 的延伸链构成（图 2C）。

多序列比对发现，MsGOLS2 蛋白与其他植物的 GOLS 蛋白展现出了高度的同源性，在功能结构域上的相似性达到 72.27%，拥有 GOLS 蛋白特有的 YFNAGM、FAEQDFLN、YNL 等[20]蛋白基序（图 3）。系统进化树分析结果显示，MsGOLS2 与蒺藜苜蓿 MtGOLS2 和大豆 GmGOLS2 蛋白亲缘关系较近（图 4）。基于以上结果，推测 MsGOLS2 为紫花苜蓿中 GOLS2 蛋白家族成员。

2.2　MsGOLS2 亚细胞定位

构建 pCF203-GOLS2-GFP 融合表达载体，并将其转入拟南芥原生质体中表达，分析 MsGOLS2 蛋白在拟南芥原生质体的定位情况。同时，使用 Nucl-mCherry 对细胞核进行染色，并以 GFP 空载体作为对照组。通过共聚焦显微镜进行观察，使用 488 nm 激光激发 GFP，并在 500～540 nm 波段检测其荧光信号；使用 580 nm 激光激发 mCherry，并在 570～



A. MsGOLS2 蛋白的亲水性/疏水性分析；B. MsGOLS2 蛋白的跨膜结构预测；C. MsGOLS2 蛋白的二级结构预测。C 图中长线代表 α 螺旋，中线代表延伸链，短线代表不规则卷曲。

图 2 MsGOLS2 蛋白生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of MsGOLS2 protein

670 nm 波段检测其荧光信号。通过对 GOLS2-GFP 融合蛋白与细胞核 mCherry 染色的共定位分析，发现 MsGOLS2 蛋白在拟南芥原生质体的细胞质和细胞核中均有表达(图 5)。

2.3 *MsGOLS2* 在紫花苜蓿中的表达模式分析

在正常条件下，*MsGOLS2* 在根中表达量最高，且极显著高于茎(图 6A)；在 NaCl 处理组中，相较于处理 0 h，NaCl 处理 4 和 8 h 后的叶和根中 *MsGOLS2* 的表达量均显著增加(图 6B)，其中根中 *MsGOLS2* 的表达量的增加幅度更大。基于以上结果，推测 *MsGOLS2* 在紫花苜蓿响应盐胁迫的过程中扮演了重要角色。

2.4 *MsGOLS2* 转基因拟南芥阳性苗的筛选和鉴定

随机挑选长势较好的野生型株系和 5 个 T_2 代转基因株系进行 RT-PCR(7A)检测和 PCR 分子鉴定(7B)，结果显示，5 个转基因株系中均有清晰的目标条带，而野生型拟南芥没有检测到 *MsGOLS2* 的表达。以上结果表明，*MsGOLS2* 已被成功整合在拟南芥基因组中并且稳定表达，挑选以上 5 个株系中 L4、L6、L7 作为后续验证转基因拟南芥耐盐性的植物材料。

2.5 *MsGOLS2* 转基因拟南芥的耐盐性分析

2.5.1 根长表型分析

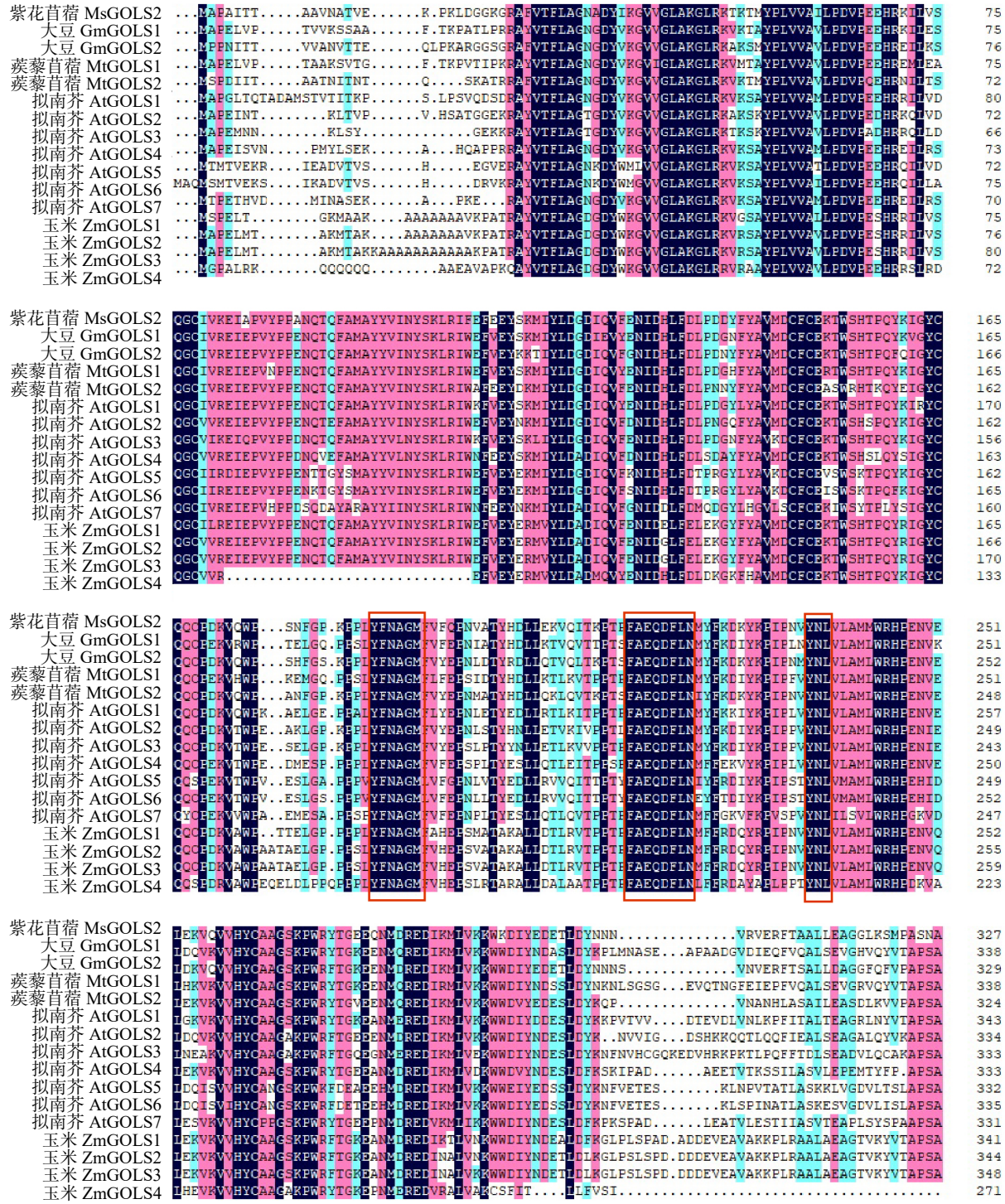
在正常培养条件下(0 mmol/L NaCl)，野生型(WT)、转空载株系(MOCK)与转基因型拟南芥株系(L4、L6、L7)没有明显表型差异(图 8A，8C)；在盐胁迫条件下(75 mmol/L NaCl)，转基因型拟南芥株系的主根长度显著高于野生型和转空载株系(图 8B，8D)。基于以上结果，推测 *MsGOLS2* 的过表达提高了拟南芥的耐盐性。

2.5.2 生理指标与抗氧化酶活性分析

丙二醛(MDA)和脯氨酸(Pro)是衡量植物耐受逆境能力的重要指标。MDA 作为脂质过氧化作用的副产物，其含量可直接反映细胞膜受损的程度。在 150 mmol/L NaCl 处理下，WT、MOCK 与转基因拟南芥 MDA 含量均上升，但转基因拟南芥的 MDA 含量显著低于 WT 和 MOCK，这表明转基因拟南芥的细胞膜脂损伤水平比 WT、MOCK 更低(图 9A)。脯氨酸是一种重要的渗透调节物质，能够有效增强植物的抗逆性。在 150 mmol/L NaCl 处理下，转基因拟南芥的 Pro 含量显著高于 WT、MOCK，表明转基因拟南芥能够合成更多的渗透调节物质，进而提升其耐盐能力(图 9B)。过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)是植物抗氧化系统的重要酶类，二者的酶活性反映了植物抗氧化系统的强弱。在 150 mmol/L NaCl 处理下，各拟南芥株系的 POD 和 SOD 活性均有所提高，但转基因拟南芥的酶活性显著高于 WT、MOCK，这表明转基因拟南芥具有更强的抗氧化能力(图 9C，9D)。综合来看，无论是在细胞损伤程度、渗透调节物质积累，还是抗氧化酶活性方面，转基因拟南芥都表现出优于野生型的适应性和抗逆性，这充分表明 *MsGOLS2* 在提高植株耐盐性方面发挥了重要作用。

2.5.3 胁迫前后 *MsGOLS2* 和抗氧化酶相关基因表达量分析

150 mmol/L NaCl 处理后，各转基因拟南芥株系的 *MsGOLS2* 的表达量均比正常条件下显著上升，而野生拟南芥和转空载体拟南芥中没有检测到



红色框代表的是 GOLS 蛋白特有的 YFNAGM、FAEQDFLN、YNL 蛋白基序。

图 3　MsGOLS2 氨基酸多序列比对

Fig. 3　Multiple sequence alignment of MsGOLS2 amino acid

MsGOLS2 的表达（图 10A）。经 NaCl 处理后，无论是 WT、MOCK 还是转基因拟南芥，其 *POD* 和 *SOD* 基因的表达量均显著上升，但转基因拟南芥中的 *POD*、*SOD* 基因表达量远远高于 WT 和 MOCK，这与酶活性的变化趋势是一致的（图 10B，10C）。基于以上结果，推测转基因拟南芥可能通过调控抗氧化酶基因的表达来显著增强对盐胁迫的响应能力。

3　讨　　论

紫花苜蓿有极高的营养价值和经济价值，是重要的牧草资源。但是近年来随着气候与环境的不断变化，土地盐碱化加剧，紫花苜蓿种植产业的发展和经济效益正面临严峻挑战。棉子糖系列寡糖在植物生长发育和逆境生理过程中发挥着重要作用，作为

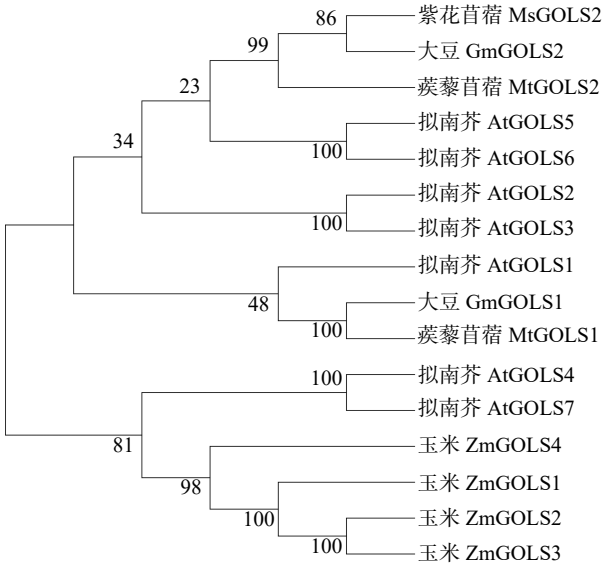
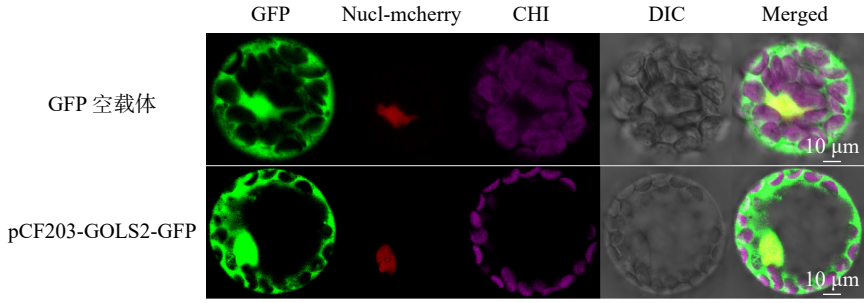


图 4 MsGOLS2 蛋白系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of MsGOLS2 protein system

棉子糖合成通路第一步的关键酶，GOLS 对 RFOs 的生物合成至关重要，更是植物逆境响应研究的一个重要切入点。因此，对紫花苜蓿 *MsGOLS* 功能的探究具有重要的科学意义与实践价值。

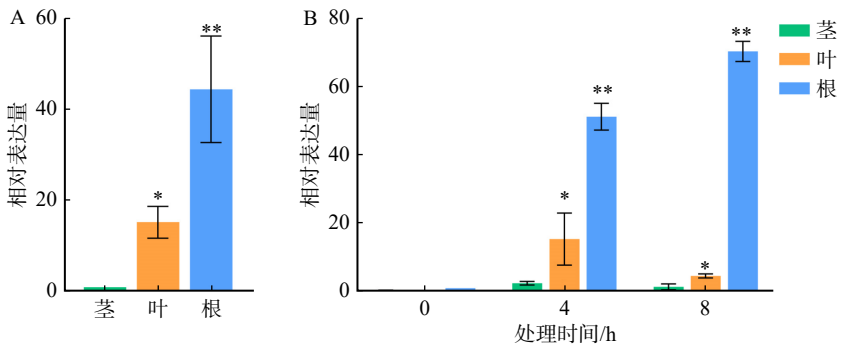
与其他已有的 GOLS 蛋白序列比对后发现，紫花苜蓿 MsGOLS 蛋白序列在进化上十分保守，表现出糖基转移酶 GT8 家族的特征[21]，不仅包含 GT8 家族经典的 DxD 和 HxxGxxKWP 保守基序，还包括 YFNAGM、FAEQDFLN、YNL 等 GOLS 蛋白特有的保守基序。进化树分析结果显示，该序列与大豆 GmGOLS2 亲缘关系较近，表明 MsGOLS 蛋白可能也具备大豆 GmGOLS2 逆境胁迫响应的功能[22]。对 MsGOLS2 蛋白的亚细胞定位显示，其在细胞质和细胞核中都有分布，这与从青[23]对巨桉（*Eucalyptus grandis*）GOLS3 的亚细胞定位结果相似，推测 MsGOLS2 蛋白不仅在 RFOs 生物合成过程发挥重要作用，可能还在逆境条件下参与细胞核内的渗透调节、信号传递等过程。本研究发现正常条件下 *MsGOLS*2 在紫花苜蓿不同器官中的表达水平存在一定差异，其中根部的表达量最高，叶其次，茎中最低。而在盐胁迫下根、茎、叶中的 *MsGOLS*2 都能够不同程度的上调，其中盐胁迫 8 h 后的根内 *MsGOLS*2 上调最为显著，推测 *MsGOLS*2 主要在根部发挥盐胁迫响应功能，而在葡萄（*Vitis vinifera*）[24]中，*VvGOLS*2 和 *VvGOLS*4 主要作用于叶片，推测不同物种在响应盐胁迫时出现了功能的分化。



从左到右分别为 GFP 绿色荧光蛋白、Nucl-mcherry、叶绿体荧光通道、明场和叠加图。

图 5 MsGOLS2 亚细胞定位

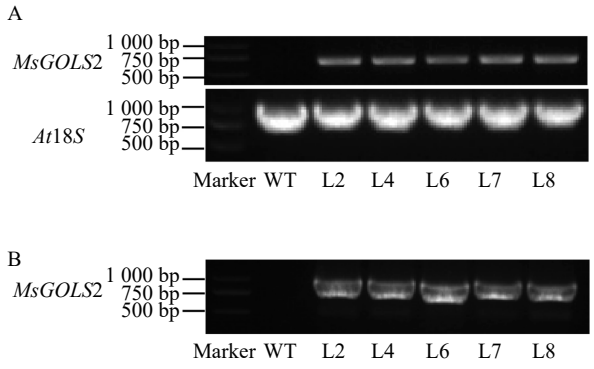
Fig. 5 Subcellular localization of MsGOLS2



A. 正常条件下 *MsGOLS*2 在不同器官中的表达量；B. 200 mmol/L NaCl 处理下 *MsGOLS*2 在不同器官中的表达量。A 图中以茎为对照，*表示与对照相比差异显著（$P < 0.05$），**表示差异极显著（$P < 0.01$）；B 图中以处理 0 h 为对照，*表示同一器官在不同处理时间表达量与对照相比差异显著（$P < 0.05$），**表示差异极显著（$P < 0.01$）。

图 6 *MsGOLS*2 的表达量分析

Fig. 6 Expression level analysis of *MsGOLS*2

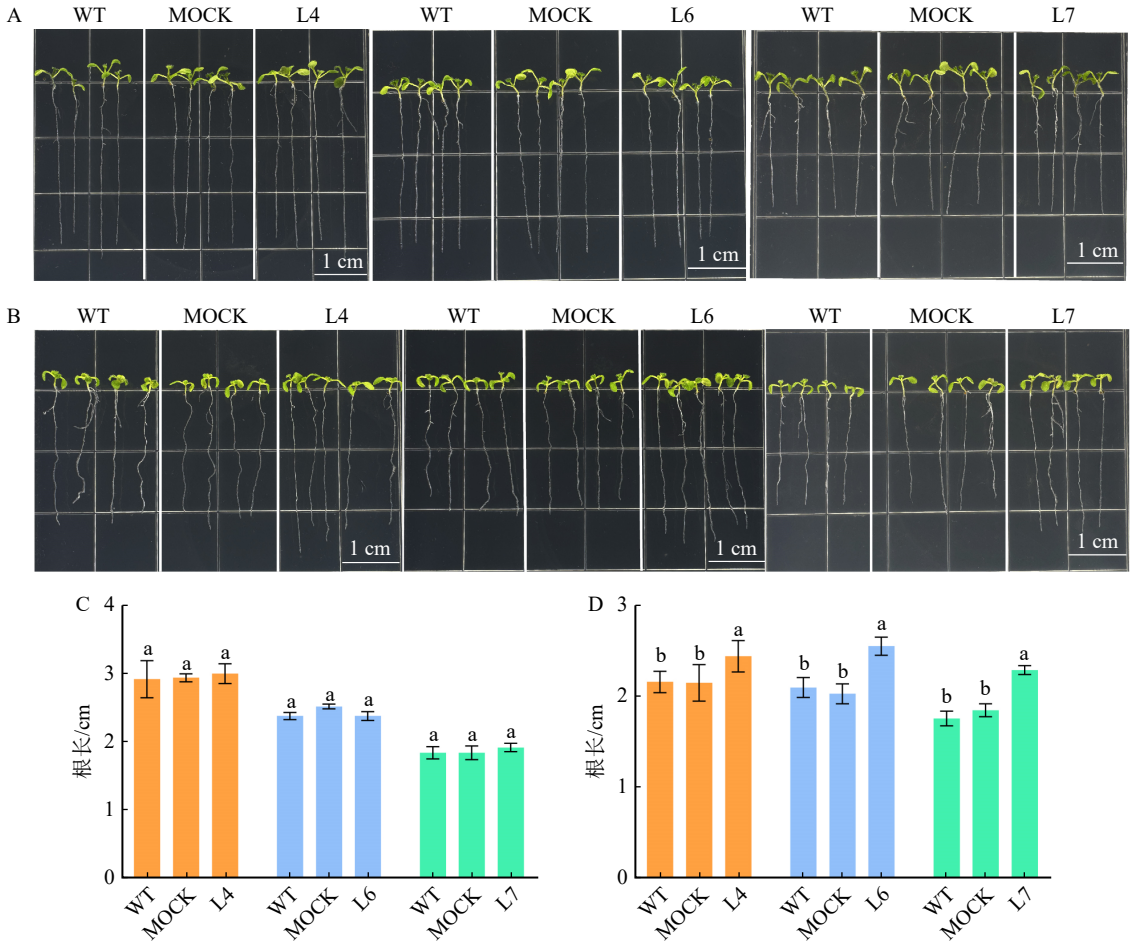


A. RT-PCR 检测，目标条带大小为 548 bp；B. 各株系转基因拟南芥分子鉴定，目标条带大小为 1 040 bp（包含 987 bp 的 *MsGOLS2* 基因）。L2、L4、L6、L7、L8 为不同的转基因株系，WT 为野生型。

图 7　转基因拟南芥中 *MsGOLS2* 鉴定结果

Fig. 7　Identification results of *MsGOLS2* in transgenic arabidopsis

前人研究[25]发现，拟南芥受到盐胁迫后，会出现主根变短、侧根减少的表型。本研究通过稳定过表达 *MsGOLS2* 获得转基因拟南芥株系，表型检测发现，盐处理下的转基因幼苗的主根长度显著长于野生型和转空载体拟南芥，说明过表达 *MsGOLS2* 基因能够提升植株根部的耐盐性，这与该基因在盐胁迫后根部表达量显著上调是一致的。为进一步在生理层面上探究 *MsGOLS2* 对植物耐盐性的影响，本研究选取了丙二醛（MDA）、脯氨酸（Pro）、过氧化物酶（POD）和超氧化物歧化酶（SOD）指标，从膜脂损伤程度、渗透调节物质含量和抗氧化酶系统活性 3 个方面进行分析。现有研究表明，MDA[26]是膜脂过氧化的产物，代表了细胞膜的损伤程度，其含量与植物的耐盐能力成反比；Pro[27]是植物体内重要的渗透调节物质，POD 和 SOD[28]是植物抗氧化系统的重要酶，对清除植物逆境胁迫下产生的活性氧、提高植物抗逆能力具有重要作用，植物的耐盐能力与以上指标密切相关。在盐处理后，转基因拟南芥比 WT 和 MOCK 的 Pro 含量、POD 和 SOD 活性更高，而 MDA 含量更低。同时盐胁迫下转基因拟南芥中的 *MsGOLS2*



A. 正常条件下野生型拟南芥（WT）、转空载体拟南芥（MOCK）和转基因拟南芥（L4、L6、L7）表型；B. 75 mmol/L NaCl 胁迫下 WT、MOCK 和转基因拟南芥株系表型；C. 正常条件下 WT、MOCK 和转基因拟南芥株系根长统计分析；D. 75 mmol/L NaCl 胁迫下 WT、MOCK 和转基因拟南芥株系根长统计分析。不同小写字母表示同一培养组中野生型拟南芥（WT）、转空载体拟南芥（MOCK）和转基因拟南芥根长存在显著性差异。下同。

图 8　不同处理中不同拟南芥株系根长分析

Fig. 8　Root length analysis of different arabidopsis strains in varied treatments

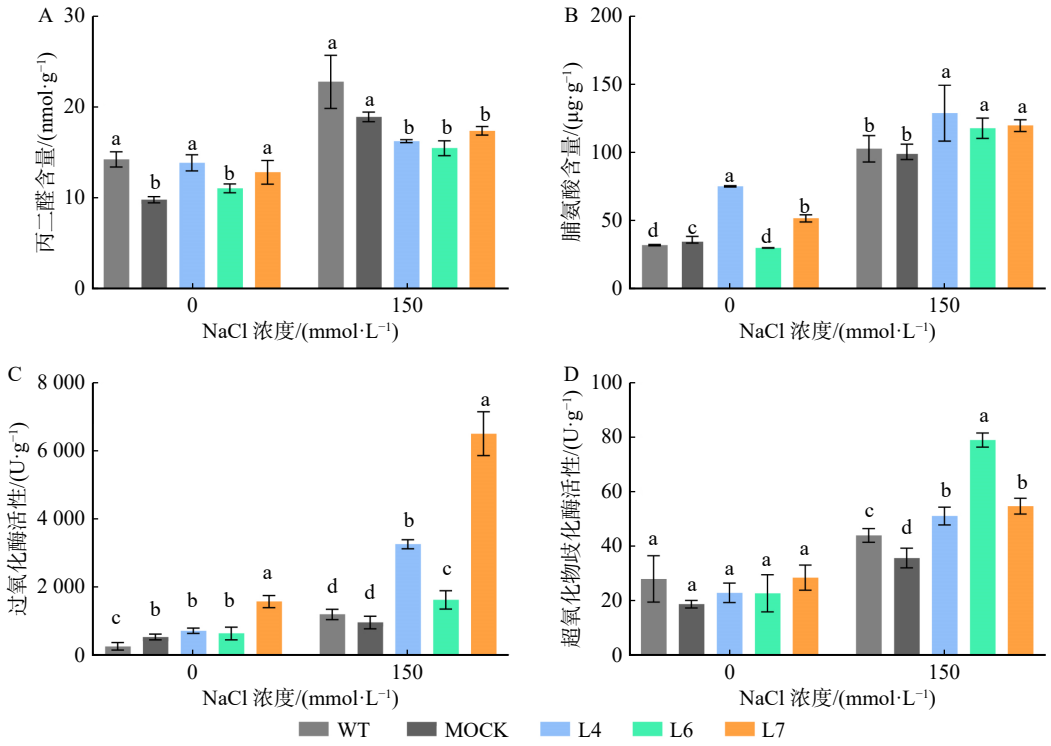
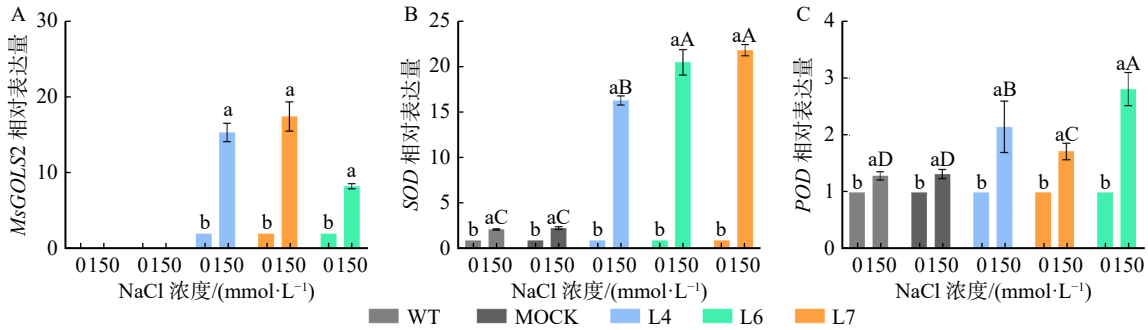


图 9 不同拟南芥株系生理指标与抗氧化酶活性分析

Fig. 9 Analysis of physiological parameters and antioxidant enzyme activities in different arabidopsis strains



不同小写字母表示同一株系在处理前后存在显著性差异，不同大写字母表示 NaCl 处理后不同株系之间存在显著性差异。

图 10 不同拟南芥株系胁迫前后 *MsGOLS2* 和抗氧化酶相关基因的表达量

Fig. 10 Expression levels of *MsGOLS2* and antioxidant enzyme related genes in different arabidopsis strains before and after stress

的表达量显著增加，且转基因拟南芥中的 *POD*、*SOD* 基因的表达量显著高于野生型和转空载体拟南芥，这与温馨等[29]和张小萌等[30]关于相关抗氧化酶基因表达量变化的研究结果一致。表明转基因拟南芥在盐胁迫下通过提升自身的渗透调节能力、抗氧化酶系统活性和相关基因表达量，来降低盐胁迫造成的膜脂损伤，进而增强植株耐盐性。

4 结 论

本研究通过克隆获得紫花苜蓿 *MsGOLS2* 基因序列，并在拟南芥中过表达 *MsGOLS2* 基因，探究 *MsGOLS2* 的耐盐功能，研究结论得到以下结论。

（1）*MsGOLS2* 基因编码区长 987 bp，共编码 328 个氨基酸。MsGOLS2 蛋白是一种以不规则卷曲为主的亲水性膜内蛋白，在进化上高度保守，且亲缘关系与大豆、蒺藜苜蓿 GOLS2 较近，属于 GOLS2 蛋白家族。

（2）*MsGOLS2* 在紫花苜蓿根内大量表达，并且能显著响应盐胁迫。

（3）过表达 *MsGOLS2* 通过提升转基因拟南芥的渗透调节能力、抗氧化酶系统活性以及抗氧化酶相关基因的表达，降低盐胁迫对拟南芥的膜脂损伤水平，进而增强转基因拟南芥的耐盐性。

研究结果不仅为深入研究紫花苜蓿 *MsGOLS2* 响应盐胁迫的作用机制提供了重要依据，同时也为紫花苜蓿耐盐种质资源的筛选培育、创新改良提供了关键的候选基因资源，对提高盐渍化土地的利用率，促进生态恢复，实现可持续发展具有重要意义。

未来可通过分子互作等实验发掘上游转录因子，进一步明确 *MsGOLS2* 具体的耐盐分子调控机制。

参 考 文 献

[1] Cook D R. *Medicago truncatula*-a model in the making[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(4): 301−304.

[2] Liu Z P, Chen T L, Ma L C, et al. Global transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid alfalfa[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83549.

[3] 杨青川. 苜蓿种植区划及品种指南 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2012.
Yang Q C. Guide for alfalfa planting zone and cultivar[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2012.

[4] 宋瑞, 张涵, 王雪萌, 等. 紫花苜蓿多组学研究进展 [J]. 中国草地学报, 2023, 45(2): 102-112.
Song R, Zhang H, Wang X M, et al. Advances in multi-omics of alfalfa[J]. Chinese Journal of Grassland, 2019, 45(2): 102−112.

[5] Tiago B D S, Luiz G E V. Involvement of the *galactinol synthase* gene in abiotic and biotic stress responses: a review on current knowledge[J]. Plant Gene, 2020, 24: 100258.

[6] Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 656.

[7] Ma S, Lü J G, Li X, et al. *Galactinol synthase* gene 4 (*CsGolS*4) increases cold and drought tolerance in *Cucumis sativus* L. by inducing RFO accumulation and ROS scavenging[J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 185: 104406.

[8] You J, Wang Y Y, Zhang Y J, et al. Genome-wide identification and expression analyses of genes involved in raffinose accumulation in sesame[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4331.

[9] Martins C P S, Fernandes D, Guimarães V M, et al. Comprehensive analysis of the *galactinol synthase* (*GolS*) gene family in citrus and the function of *CsGolS*6 in stress tolerance[J]. PLOS One, 2022, 17(9): e0274791.

[10] 谷雷. 玉米肌醇半乳糖苷合成酶 2 基因 (*ZmGOLS*2) 的功能和表达调控研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
Gu L. Function and expression regulation of maize *galactinol synthase* 2 gene (*ZmGOLS*2)[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.

[11] Wang Z, Zhu Y, Wang L L, et al. A WRKY transcription factor participates in dehydrationtolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the *galactinol synthase* (*BhGolS*1) promoter[J]. Planta, 2009, 230(6): 1155−1166.

[12] 覃信梅, 卢永彬, 江祈贵, 等. 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因的鉴定及序列分析 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 56−60.
Qin X M, Lu Y B, Jiang Q G, et al. Identification and sequence analysis of *galactinol synthase* gene in *Primulina spinulosa*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(8): 56−60.

[13] Zhuo C L, Wang T, Lu S Y, et al. A cold responsive *galactinol synthase* gene from *Medicago falcata* (*MfGolS1*) is induced by myo-inositol and confers multiple tolerances to abiotic stresses[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 149(1): 67−78.

[14] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought-and cold-inducible genes for *galactinol synthase* in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2002, 29(4): 417−426.

[15] Xiao Y Z, Dong Y, Zhang Y H. et al. Two galactinol synthases contribute to the drought response of *Camellia sinensis*[J]. Planta, 2023, 258(5): 84.

[16] Salvi P, Kamble N U, Majee M. Stress-inducible *galactinol synthase* of chickpea (*CaGOLS*) is implicated in heat and oxidative stress tolerance through reducing stress-induced excessive reactive oxygen species accumulation[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(1): 155−166.

[17] 刘宸铭, 赵克勇, 悦曼芳, 等. 玉米转录因子 *ZmEREB*180 调控根系生长发育及耐逆的功能研究 [J]. 作物学报, 2024, 50(8): 1920−1933.
Liu C M, Zhao K Y, Yue M F, et al. Functional study on the regulation of root growth and development and stress tolerance by maize transcription factor *ZmEREB*180[J]. Acta Agronomica Sinica, 2024, 50(8): 1920−1933.

[18] 张锦锦. 紫花苜蓿 *MsWRKY*33 转录因子调控紫花苜蓿耐盐性的功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
Zhang J J. The study on the function of *MsWRKY*33 transcription factor in regulating salt tolerance of *Medicago sativa* L.[D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Science, 2021.

[19] 王园, 王晶, 李淑霞. 紫花苜蓿 *MsBBX*24 基因的克隆及耐盐性分析 [J]. 草业学报, 2023, 32(3): 107−117.
Wang Y, Wang J, Li S X. Cloning of *MsBBX*24 from alfalfa (*Medicago sativa*) and determination of its role in salt tolerance[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(3): 107−117.

[20] 从青, 程龙军, 杨宁. 植物肌醇半乳糖苷合酶的生理功能和调控机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(11): 1193−1200.
Cong Q, Cheng L J, Yang N. Physiological function and regulation mechanism of galactinol synthase in plants[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 35(11): 1193−1200.

[21] Yin Y B, Chen H L, Hahn M G, et al. Evolution and function of the plant cell wall synthesis-related glycosyltransferase family 8[J]. Plant Physiology, 2010, 153(4): 1729−1746.

[22] 刘丹, 王柯蔼, 倪蓬, 等. 大豆 *GolS* 基因家族鉴定及盐旱胁迫下的表达分析 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3757−3772.
Liu D, Wang K A, Ni P, et al. Identification of soybean *GolS* gene family and analysis of expression patterns under salt and drought stresses[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(10): 3757−3772.

［23］ 从青. 巨桉抗逆相关基因 *EgrGolS*3 的鉴定及功能研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
Cong Q. Identification and function of the stress resistance related gene *EgrGolS*3 in *Eucalyptus grandis*[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.

［24］ 冯睿杰, 侯丽霞, 郭扬, 等. 葡萄肌醇半乳糖苷合成酶基因 *VvGOLS*2-4 的克隆及表达特性分析 [J]. 华北农学报, 2017, 32(2): 87−95.
Feng R J, Hou L X, Guo Y, et al. Gene cloning and expression analysis of *galactinol synthase* gene *VvGolS*2-4 in grape[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(2): 87−95.

［25］ Magdalena M J, Huub C J H, Selena M, et al. Capturing arabidopsis root architecture dynamics with root-fit reveals diversity in responses to salinity[J]. Plant Physiology, 2014, 166(3): 1387−1402.

［26］ 陈涛, 王贵美, 沈伟伟, 等. 盐胁迫对红麻幼苗生长及抗氧化酶活性的影响 [J]. 植物科学学报, 2011, 29(4): 493−501.
Chen T, Wang G M, Shen W W, et al. Effect of salt stress on the growth and antioxidant enzyme activity of kenaf seedlings[J]. Plant Science Journal, 2011, 1(4): 493−501.

［27］ 贾冰晨. 盐胁迫下异源表达 *SaP5CS* 拟南芥耐盐性及根部发育调控的研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2020.
Jia B C. Research on the salt tolerance and regulation of root development on heterologous expression of *SaP5CS* in *Arabidopsis thaliana* under slat stress[D]. Yantai: Yantai University, 2020.

［28］ 朱晨晨, 史昆, 何沁坤, 等. 混合盐碱胁迫对紫花苜蓿幼苗生理和基因表达的影响 [J]. 草地学报, 2024, 32(4): 1044−1054.
Zhu C C, Shi K, He Q K, et al. Effects of mixed saline-alkali stress on physiology and gene expression of alfalfa seedlings[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(4): 1044−1054.

［29］ 温馨, 殷可欣, 马思圆, 等. 过表达胡杨 *PePKS*5 提高拟南芥耐盐性 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(2): 62−74.
Wen X, Yin K X, Ma S Y, et al. Overexpression of *Populus euphratica PePKS*5 enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(2): 62−74.

［30］ 张小萌, 殷可欣, 安珂悦, 等. 过表达胡杨 *PeCPK*7 提高拟南芥耐盐性 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(11): 62−75.
Zhang X M, Yin K X, An K Y, et al. Overexpression of *Populus euphratica CPK*7 enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(11): 62−75.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 康向阳）